



TITLE:

hCG産生腫瘍の免疫学的局在診断 に関する基礎的研究 --131I-anti hCG- β による腫瘍イメージ--

AUTHOR(S):

山中, 望

CITATION:

山中, 望. hCG産生腫瘍の免疫学的局在診断に関する基礎的研究 --131I-anti hCG- β による腫瘍イメージ--. 泌尿器科紀要 1983, 29(6): 601-613

ISSUE DATE:

1983-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/120193>

RIGHT:

hCG 産生腫瘍の免疫学的局在診断に関する基礎的研究

——¹³¹I-anti hCG- β による腫瘍イメージ——

神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 石神 襄次教授)

山 中 望

RADIOIMMUNODETECTION OF CHORIOCARCINOMA
IN NUDE MOUSE BY RADIOLABELED ANTIBODY
TO HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN β -SUBUNIT

Nozomu YAMANAKA

*From the Department of Urology, School of Medicine, Kobe University**(Director: Prof. J. Ishigami)*

Photoscans and organ radioactivity were assessed with radiolabeled antibodies to hCG or hCG- β subunit in nude mice bearing hCG-producing tumors.

¹²⁵I-anti hCG or ¹²⁵I-anti-hCG- β subunit was administered to nude mice bearing an hCG-producing tumor, GCH-1nu. Measurement of radioactivity revealed specific accumulation of both antibodies into the tumor. Especially the accumulation of ¹²⁵I-anti hCG- β subunit on the 3rd day of administration was high, being about 4 times higher than the nonspecific accumulation in the liver.

The localization of hCG in the tumor was examined by the indirect peroxidase-antiperoxidase method using anti-hCG, and anti hCG- α subunit, and hCG- β subunit. The immunoperoxidase reaction was positive, and the accumulation of these radiolabeled antibodies in the tumor is suggested to be an immunologically specific phenomenon.

The tumor in the tumor-bearing nude mouse injected with ¹³¹I-anti hCG or ¹³¹I-anti hCG- β subunit could be visualized as a hot area by external scintigraphy. Especially, the tumor image produced by the accumulation of anti hCG- β subunit was very clear against the background radiation.

Key words: Radiolabeled hCG- β subunit antibody, Radioimmunodetection, Choriocarcinoma, Nude mouse

緒 言

睾丸腫瘍は男性悪性腫瘍のなかで、乳幼児および社会的活躍期にある青壮年層に多く見られることから、泌尿器科領域では重要な疾患とされている。

近年、本症に対する研究が活発におこなわれているが、とくに化学療法の進歩は著しく、進行癌症例でも延命を期待しうる場合が少なからず経験され、curable solid tumor¹⁾のひとつと考えられるにいたった。いっぽう、診断面では、従来のリンパ管造影、Com-

puted Tomography (以下、CT) などに加え、human chorionic gonadotropin (以下、hCG) や alpha-fetoprotein (以下、AFP) などの血清腫瘍マーカーの意義が解明され²⁻⁶⁾、これらを用いた多角的診断がなされるようになった。なかんずく、血中 hCG 値および AFP 値の測定は腫瘍の在否診断において有用で、化学療法の効果判定とともに経過観察に不可欠と考えられる。しかし、これら現有の診断方法によっても転移巣の局在をあきらかにしえず、治療に苦慮せねばならない症例がしばしば経験される。すなわち、肺、

肝、脳などの臓器への転移巣は前述のCTなどにより比較的容易に診断されるが、後腹膜腔、縦隔洞および他のリンパ節などへの転移巣の早期発見あるいは後腹膜リンパ節廓清術後の再発に関しては、これら現有の検査法が無力である場合が少なくない。このような症例では、転移巣の局在を体外から確実に描出しうるなんらかの新しい診断技術の開発が望まれる。

ところで、carcinoembryonic antigen (以下、CEA) は消化管領域における癌関連抗原のひとつで、消化管腫瘍の血清腫瘍マーカーとして汎用されている。

Goldenberg らはこの CEA に対する特異抗体のラジオアイソトープ化合物が CEA 産生腫瘍に特異的に集積することを証明し^{7,8}、腫瘍の体外からの局在診断に有用であることを報告した^{9,10}。これらの研究を契機として、ラジオアイソトープ標識特異抗体を用いたいわゆる Radioimmunodetection 技術が各方面で研究されるようになった。乳がん腫瘍においても、AFP や hCG に対する抗体を用いて本法を応用しようと考えられるが、すでに AFP 抗体については研究が進められており¹¹⁻¹⁴、臨床応用への可能性が示唆されている。欧米では hCG 抗体を応用した Radioimmunodetection の報告が散見¹⁵⁻¹⁷されるが、いずれも hCG (whole) 抗体を用いたものであり、免疫学的特異性等について検討の余地があると考えられる。そこで著者は hCG 分子に対する抗血清とともに、hCG のホルモン特異性が存在するその β -subunit (以下、hCG- β) に対する抗血清を精製し、Radioimmunodetection におけるこれら抗体の有用性を検討した。この結果、とくに ¹³¹I-anti hCG- β によりきわめて明瞭に腫瘍イメージを描出することに成功し、本法の臨床応用への可能性が示唆された。

実験方法

1) 抗血清の作製および精製

抗血清の作製は Vaitukaitis ら¹⁸の方法に準じておこなった。New Zealand white rabbit (3 month old) に hCG (免疫活性 4400 IU/mg, 持田製薬) 200 μ g, complete Freund's adjuvant 1.2 ml, 結核菌乾燥末 2.5 mg を生理食塩水 2 ml と混合して乳剤としたのち、背部、足蹠の約30カ所に少量ずつ皮内注射し、さらに別部位に 0.5 ml の百日咳ワクチンを皮内注射した。さらに2週間ごとに hCG 100 μ g, incomplete Freund's adjuvant 1.2 ml を生理食塩水 1.0 ml と混合して、計4~5回免疫した。初回免疫後7~10日おきに採血し、Roche assay method¹⁹によって抗体価を測定した。抗体価が 5×10^5 程度まで上昇

した時点で心臓穿刺により全採血し、抗血清を得た。hCG- β 抗血清および hCG- α subunit (以下、hCG- α) 抗血清は同様の手順によって作製されたもので、本学産婦人科教室、西村隆一郎博士²⁰より提供を受けたものを使用した。

上記抗血清の精製手順を Table 1 に示す。抗血清の38%硫酸分画を 0.01 M PBS にて透析後、DEAE セルロースカラム (3 cm \times 21 cm) に添加し、IgG 分画としたのち、immunoabsorbent affinity chromatography²¹⁾により特異的精製をおこなった。すなわち、CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) 3 gr と精製 hCG (免疫活性, 10000 IU/mg) 20 mg を 0.5 M NaCl を含む NaHCO₃ 緩衝液 (pH 8.3) をカップリングバッファーとして 4 $^{\circ}$ C, 15時間インキュベート、これを 0.8 cm \times 15 cm のカラムに充填し、0.1 M モノエタノールアミン (pH 8.5) を流して過剰活性基をブロッキングしたのち、0.01 M PBS (pH 7.4) で十分緩衝化をおこなった。つぎに、前述の IgG 分画 15 mg を本カラムに添加し、0.01 M PBS にて非吸着分の溶出をおこない OD 280 nm にて蛋白量をモニターしつつ分画採取し、溶出操作が完全におこなわれたことを確認した。つぎに 0.17 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.3) に溶出液を変更し、hCG に結合した hCG 抗体を解離せしめ、ただちに 0.5 MK₂HPO₄ にて中和をおこなった。このようにして精製した IgG 分画を蒸留水にて十分透析後、凍結乾燥して本実験に使用した。なお、この affinity chromatography による抗体の回収率は DEAE セルロースカラムで得られた IgG 分画の約10%であった。

2) 抗体の標識法

上記の精製抗体および normal rabbit IgG (Miles Laboratoire's I.N.C) をクロラミンT法によって ¹²⁵I あるいは ¹³¹I を用いて標識し、Sephadex G-200 によるゲルカラムにて非結合アイソトープの分離をお

Table 1. Antibody preparations

Antiserum
↓ fractionation by (NH ₄) ₂ SO ₄ at 38% saturation
Precipitate
↓ DEAE cellulose column chromatography
IgG fraction
↓ affinity chromatography using hCG linked to CNBr-activated Sepharose 4B
specific antibody to hCG or hCG- β

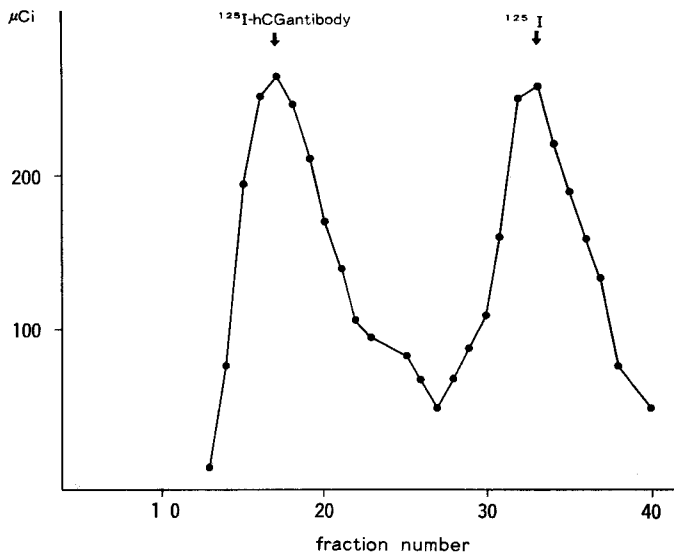


Fig. 1. Both hCG and hCG- β antibody were radiolabeled with ^{125}I or ^{131}I by chloramine T method. The radiolabeled antibody preparations were separated from unbound radionuclide by filtration over Sephadex G-200

こなった (Fig. 1). specific activity は $10\sim 15\ \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった.

3) 絨毛癌—ヌードマウスモデルの作製

移植用ヌードマウスは BALB/cA-nu/JCL を遺伝的背景とする 4～6 週齢の雄ヌードマウスで、すべて S.P.F (specific pathogen free) 下で飼育した. hCG 産生株として樹立された絨毛癌由来の GCH-1 nu 株²³⁾を 1×10^8 コ/0.1 ml の細胞浮遊液として、このヌードマウスの背部皮下に移植した. 腫瘍が示指頭大になった時点で摘出し、細切したのち、19 Gage の移植針を用いて継代した.

4) 移植腫瘍の病理組織学的検索および腫瘍細胞における hCG の組織学的局在性について

前述の方法で数代を継代したヌードマウスについて、腫瘍が示指頭大となった時点で適宜、移植腫瘍および肝、腎、肺などの主要臓器を摘出した. これらを肉眼的に観察し、その後 10% 緩衝ホルマリンで固定、パラフィン包埋薄切標本を作製し、hematoxylin-eosin 染色をおこない検鏡した.

つぎに、Sternberger ら²⁴⁾の Peroxydase-anti-peroxydase 法 (以下、PAP 法) により、腫瘍組織中の hCG の局在を検索した. 一次抗血清として前述の rabbit anti hCG, anti hCG- α (各 1,000 倍稀釈) および anti hCG- β (2,000 倍稀釈) を用いた. 二次血清は抗ウサギ IgG ヤギ血清 (Dakopatts, Denmark)

20 倍稀釈液、三次血清には Peroxidase-antiperoxydase complex (Dakopatts, Denmark) 50 倍稀釈液を用いた.

5) 腫瘍のラジオアイソトープ標識抗体の取り込みについて

^{125}I -anti hCG あるいは ^{125}I -anti hCG- β を前述の担癌ヌードマウスに 20×10^4 cpm ずつ腹腔内投与し、その後 1, 2, 3 および 4 日目に両群とも 3 匹ずつ屠殺し、腫瘍および他の肝、腎、肺などの諸臓器の放射能を γ -カウンターで測定した. tissue (cpm/g)/blood (cpm/g) ratio すなわち、各臓器の単位重量あたりの放射能を血液単位重量あたりの放射能で除した値を求め、それぞれの実質的な放射能集積を比較した. また、肝はヌードマウスにおける最大の臓器であるとともに非特異的に IgG を取り込むことから、tumor (cpm/g)/liver (cpm/g) ratio を求めて ^{125}I -anti hCG, ^{125}I -anti hCG- β , ^{125}I -normal rabbit IgG の三者間の比較をおこなった.

つぎに、シンチスキャンニングによる腫瘍イメージの描出を試みた. ^{131}I -anti hCG あるいは ^{131}I -anti hCG- β を担癌ヌードマウス (anti hCG 群 3 匹, anti hCG- β 群 3 匹) の腹腔内に $40\sim 50\ \mu\text{Ci}$ 投与し、ビンホールコリメーターを用いて 24 時間後および 48 時間後に腫瘍イメージの描出をおこない、画像を核医学処理装置 (TOSHIBA, Nuclear Medicine Data-

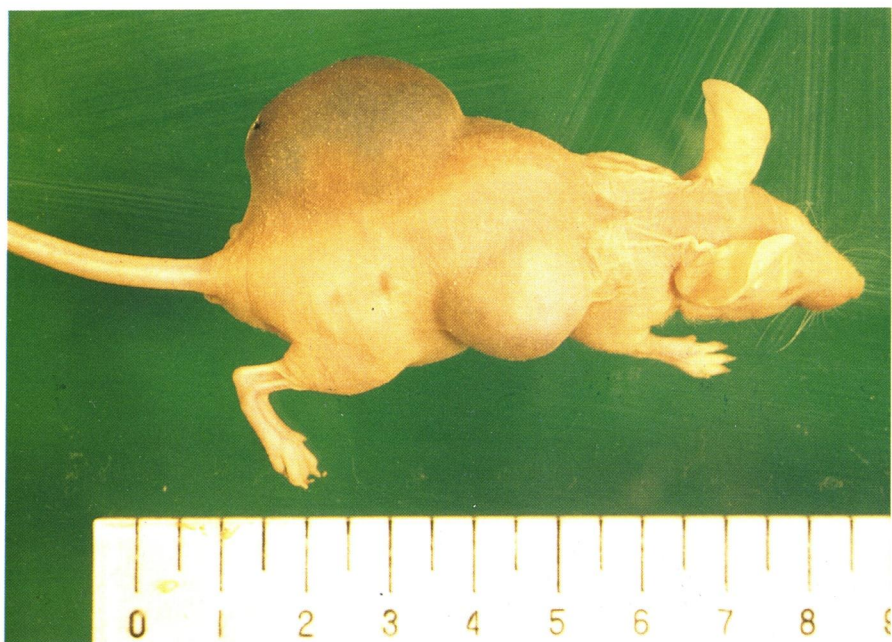


Fig. 2. Appearance of GCH-Inu tumor in the nude mouse

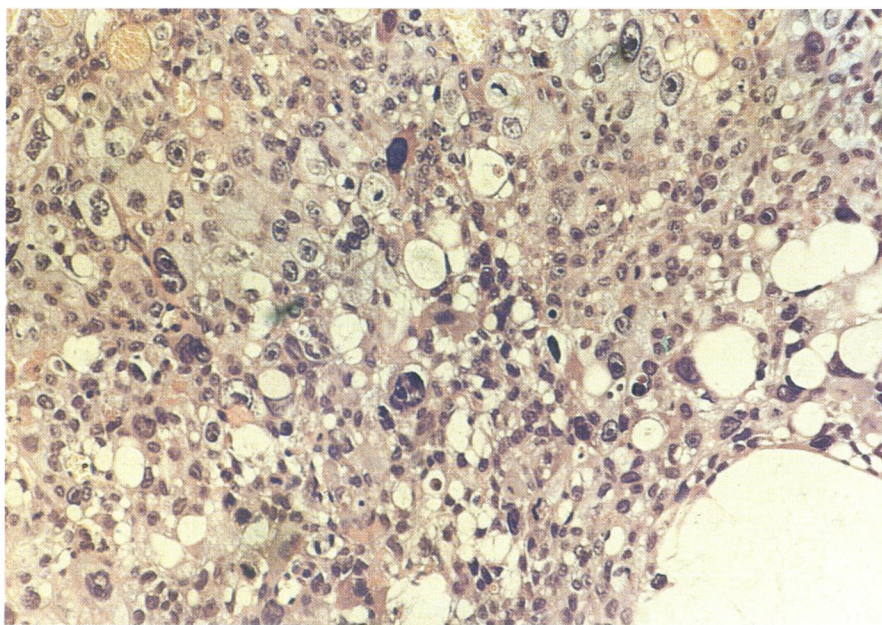


Fig. 3. Photomicrograph of GCH-Inu tumor transplanted to nude mouse. (H.E stain $\times 200$)

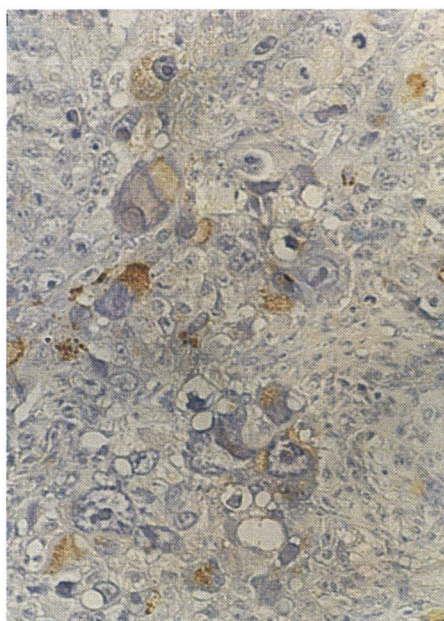


Fig. 4-a

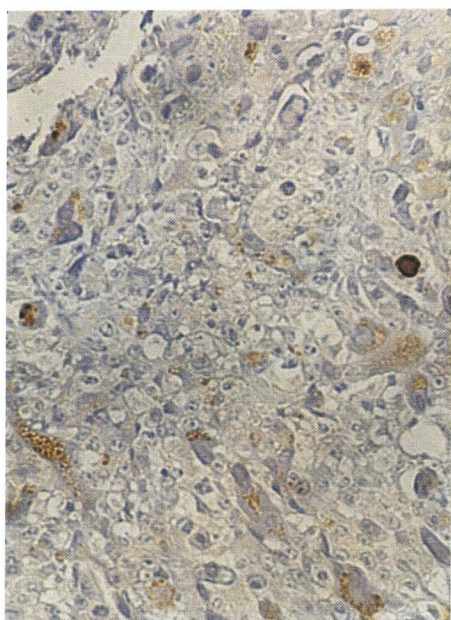


Fig. 4-b

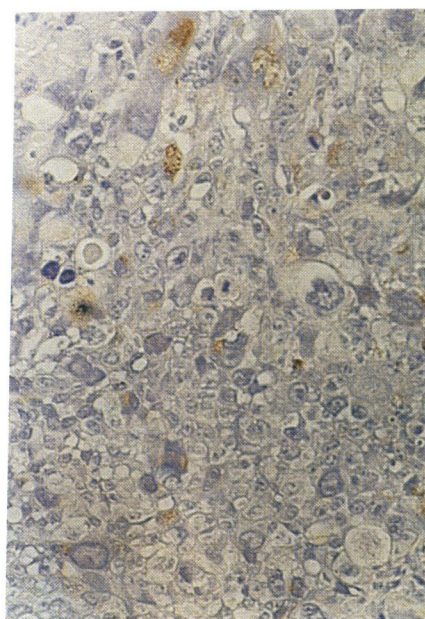


Fig. 4-c

Fig. 4. Positive immunoperoxidase reaction for hCG- β subunit in syncytiotrophoblastic cells (Fig. 4-a), both hCG (Fig. 4-b) and hCG- α subunit (Fig. 4-c) showed positive reaction. ($\times 200$)

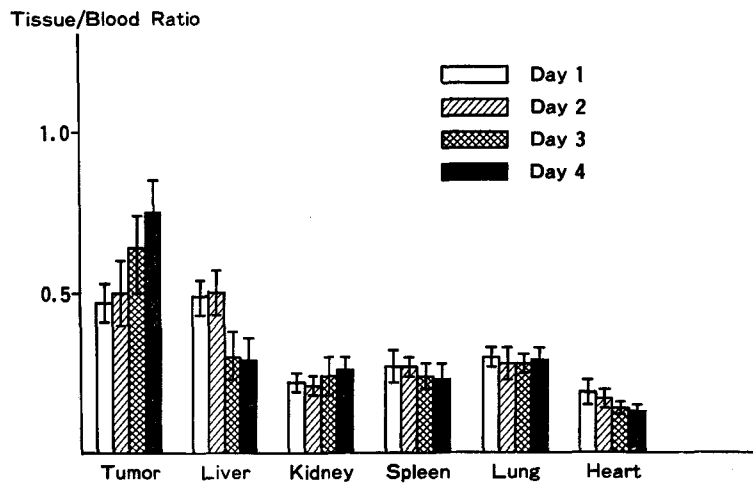


Fig. 5. Tissue/blood ratios obtained after injection of ^{125}I -anti hCG into nude mice bearing GCH-1nu tumors

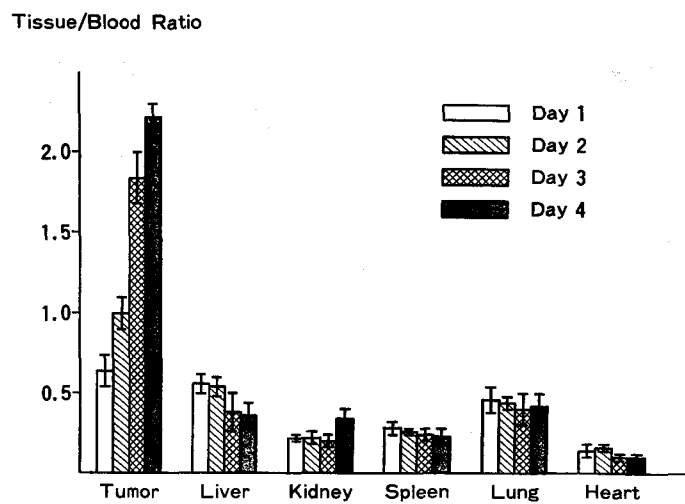


Fig. 6. Tissue/blood ratios obtained after injection of ^{125}I -anti hCG- β into nude mice bearing GCH-1nu tumors

processor DAP-8000) により処理した。なお、腫瘍を移植していない正常ヌードマウスに ^{131}I -anti hCG を投与したものをコントロール群とした ($n = 3$)。

実験結果

1) 担癌ヌードマウスの病理組織学的検索および間接 PAP 法による hCG の組織局在性について

GCH-1nu 株のヌードマウスへの生着率を Table 2 に示す。継代するにしたがい安定した生着率となり 5～9 代目では 90.8% (59/65) と良好であった。(なお、本株は細胞培養の状態で新潟大学産婦人科教室より提供を受けたものであるが、便宜上、当教室で最初にヌードマウスに生着したものを初代とした。)

Table 2. No. of successful transplation of GCH-1nu

	No. of successful transplantation	%
1st Generation	2/5	40.0
2nd Generation	4/5	80.0
3rd Generation	7/10	70.0
4th Generation	9/10	90.0
5th-9th Generation	59/65	90.8
Total	81/95	85.3

生着した腫瘍は比較的充実性に発育するものや、血性の内容物を貯留し嚢腫様の発育を示すものがあり、その発育状態は一定していなかった (Fig. 2)。また、一般に腫瘍は皮下組織内に限局しており皮膚への浸潤は認められなかったが、一部筋層へ浸潤するものが認められた。腫瘍の hematoxylin-eosin 染色標本では、大きな核と明るい胞体を持った cytrophoblast でほとんどがしめられる典型的な絨毛癌の形態が見られ (Fig. 3)、田中の報告²³⁾とほぼ同様の所見が観察された。

間接 PAP 法では一次抗血清として anti hCG, anti hCG- α および anti hCG- β の三者を用い、いずれも syncytiotrophoblast 様細胞に陽性所見が認められた (Fig. 4a-c)。

2) ラジオアイソトープ標識抗体投与後の放射能分布について。 ^{125}I -anti hCG 投与群における tissue/blood ratio を Fig. 5 に示す。腫瘍と肝の第 1 日

目の tissue/blood ratio の平均値は腫瘍で 0.48, 肝で 0.49 とほぼ同程度であったが、肝ではその後放射能が経時的に減少傾向を示し第 4 日目で 0.28 となったのに対し、腫瘍では第 4 日目で 0.76 と放射能の増加傾向が認められた。腎、脾、肺および心では観察した 4 日間ともに、tissue/blood ratio の平均値は 0.13～0.30 で、腫瘍に比し低値であった。

Fig. 6 は ^{125}I -anti hCG- β 投与群の放射能分布を示したものである。 ^{125}I -anti hCG 投与群と同様、第 1 日目における腫瘍と肝の tissue/blood ratio の平均値は腫瘍で 0.63, 肝で 0.56 とほぼ同程度の取り込みであったが、その後肝では減少傾向が見られ、第 4 日目に 0.35 となったのに対し、腫瘍では増加傾向が見られ、第 4 日目には 2.23 と著明な放射能集積が確認された。その他の臓器では、観察された 4 日間とも tissue/blood ratio の平均値は 0.10～0.45 と腫瘍に比し低値を示した。つぎに、 ^{125}I -anti hCG 投与群と ^{125}I -anti hCG- β 投与群の第 3 日目の tissue/blood ratio を比較すると (Fig. 7)、腫瘍における ^{125}I -anti hCG- β 投与群の平均値は 1.83 と ^{125}I -anti hCG 投与群の 0.60 に比べ約 3 倍とより強い放射能集積が認められたが、他の臓器では両者間の放射能分布に著明な差異は認められなかった。

Fig. 8 は tumor/liver ratio を示したものである。 ^{125}I -normal rabbit IgG を用いた時の tumor/liver ratio は 4 日間とも 0.9～1.25 の範囲で、腫瘍と肝にほぼ同程度取り込まれており、経時的なあきらかな上昇は見られなかった。 ^{125}I -anti hCG では第 3 日目の腫瘍への集積は肝への集積の 2.0 倍、第 4 日目では 2.7 倍であった。 ^{125}I -anti hCG- β では第 3 日目に 4.3 倍、第 4 日目には 5.8 倍ときわめて高値となり、hCG- β 抗体の腫瘍への特異的集積がうかがわれた。

3) シンチスキャンニングによる腫瘍イメージの描出

Fig. 9 はコントロール群の 1 例を示したもので、正常雄ヌードマウスに ^{131}I -anti hCG 投与後 24 時間目のシンチグラフィーである。肝、肺、胃、脾、膀胱などに放射能の分布が認められた。なお、画像は前述のようにコンピューターによって処理されたもので白色がもっとも hot な部分を示し、赤、黄、緑、青の順に放射能は低くなっている。

Fig. 10 b～d は担癌ヌードマウス (Fig. 10-a) に対しておこなったシンチグラフィーの 1 例を示したものである。 ^{131}I -anti hCG 投与例では、ヌードマウスの左腰部皮下に移植した腫瘍に一致して 24 時間後から腫瘍イメージが描出され始めたが、肝、肺、脾、心などの集中した部位に強い放射能集積が認められた。

Tissue/Blood Ratio

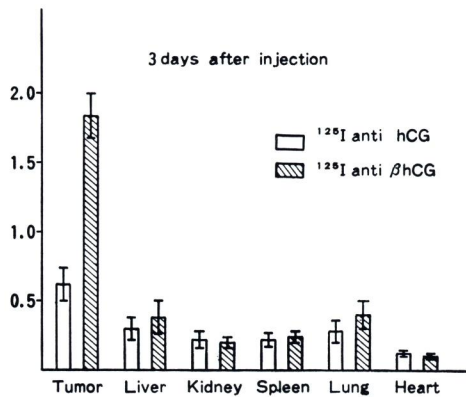


Fig. 7. Comparison of body distribution of radioactivity between ^{125}I -anti hCG and ^{125}I -anti hCG- β , three days after injection

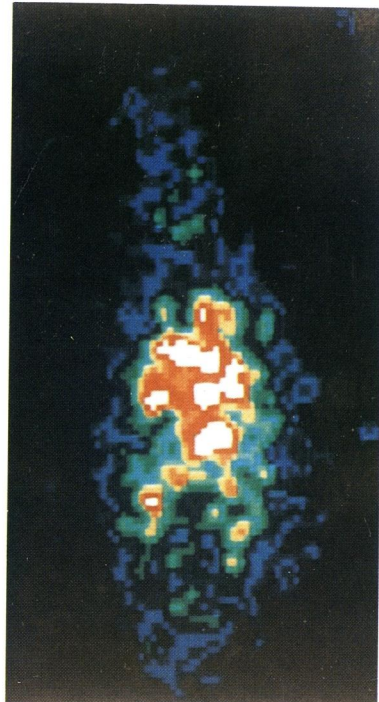


Fig. 9. Photocan of normal nude mouse receiving ^{131}I -anti hCG revealed an increased uptake in the liver, the lung, the stomach, the spleen and the bladder

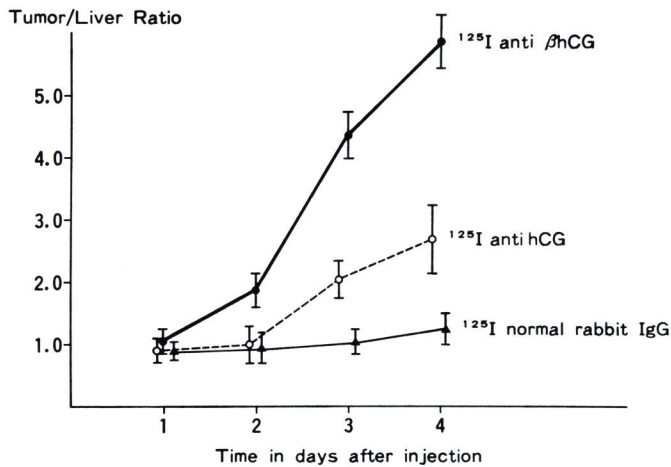


Fig. 8. Tumor/liver ratios of ^{125}I -normal rabbit IgG, ^{125}I -anti hCG and ^{125}I -anti hCG- β subunit in nude mice bearing GCH-Inu tumors



Fig. 10-a. The mouse bearing hCG producing tumor (GCH-lnu) was injected radiolabeled antibodies

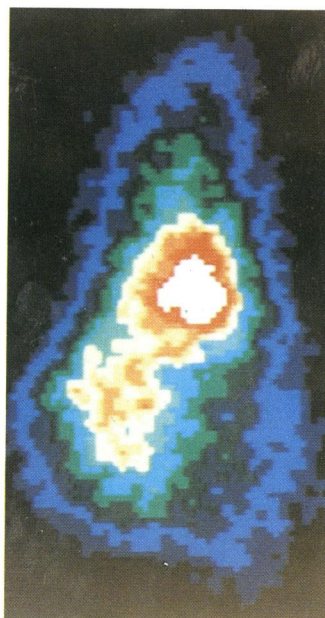


Fig. 10-b. Photoscan of the nude mouse 24 hours after injection of ^{125}I -anti hCG. The tumor was not clearly visualized against background radiation

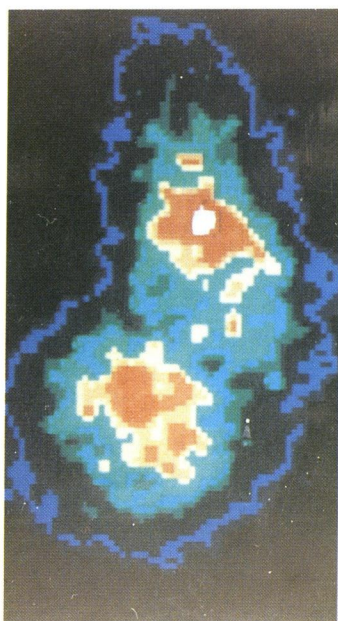


Fig. 10-c. Photoscan of the nude mouse 48 hours after injection of ^{125}I -anti hCG. The tumor was visualized, but the radioactivity in the tumor was as much as in the other organs

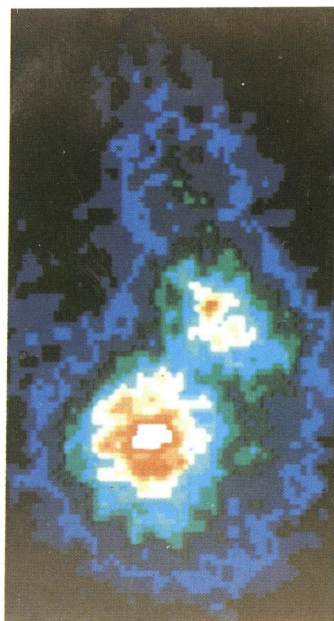


Fig. 10-d. Photoscan of the nude mouse 48 hours after injection of ^{125}I -anti hCG- β . The tumor was visualized well

(Fig. 10-b). 48時間後にはバックグラウンドの減少とともに腫瘍イメージが明瞭となるが、いぜんとして、肝、肺、脾、心などの集中した部位に腫瘍と同程度の放射能集積が認められ、満足すべき腫瘍イメージは得られなかった (Fig. 10-c). Fig. 10-d は ^{131}I -anti hCG- β 投与後48時間目のシンチグラフィであるが、 ^{131}I -anti hCG 投与例 (Fig. 10-c) に比しきわめて明瞭な腫瘍イメージが得られた。

考 察

悪性腫瘍を放射性物質を用いて陽性像として描出させる方法は古くから腫瘍診断学における重要なテーマのひとつである。近年、Gallium citrate (^{67}Ga), Selenomethionine (^{75}Se), Indiumchloride (^{111}In) などの腫瘍親和性核種の開発はめざましく、とくに、 ^{67}Ga はそのすぐれた腫瘍親和性から一般臨床にも広く応用されている。ところが、これらは炎症性病巣にも取り込まれることや、腫瘍への集積機構がほとんど解明されていないことから、腫瘍のみを描出する特異的方法とは言えない。

これらの腫瘍親和性核種に対し、免疫学的機構を応用し、腫瘍を描出させる方法がある。1966年、McCaardle ら²⁵⁾ はラットフィブリノーゲンに対する家兎抗血清を作製し、本抗体の ^{131}I -化合物を用いて悪性腫瘍を描出させることに成功した。また、1967年、Spar ら²⁶⁾ は ^{131}I -フィブリノーゲン抗体が epsilon amino capronic acid との併用によってさまざまな腫瘍に取り込まれることを報告している。これらの現象はフィブリノーゲンとフィブリノーゲン抗体の間の抗原-抗体反応に基づくものであるが、腫瘍患者におけるフィブリノーゲンの増加は特異的なものでないこと、また、腫瘍以外のフィブリノーゲンの増加するような病態が存在することなどにより、その診断上の信頼性は満足できるものではない。

このような難点を克服するために、腫瘍組織の特異抗原に対する抗体を利用する方法が開発され始めた。1973年、Primus ら⁷⁷⁾ は CEA 抗体が CEA 産生腫瘍に特異的に集積することを組織内放射能の測定により証明し、また、Goldenberg ら⁸²⁾ は1974年、 ^{131}I -anti CEA 投与後シンチスキャンニングによって腫瘍を陽性像として描出することに成功した。さらに1978年、Belitsky ら²⁷⁾ は腎細胞癌の描出物に対する抗体のラジオアイソトープ化合物によって腎細胞癌の転移巣の局在を体外から100% (6例中6例) 描出し得たと報告しており、腫瘍に特異的な抗体を利用した核医学的診断法は飛躍的な進歩をとげようとしている。

さて、睾丸腫瘍の血清マーカーとして hCG および AFP が有意義であることは前述したが、著者の教室の成績⁵⁾によれば血清 hCG は seminoma 群では28.6%, non-seminoma 群では50%の陽性率を示し血清 AFP は前者ではすべて陰性であるが、後者では70%の陽性率であった。また hCG, AFP の両者あるいはどちらか一方が陽性となる場合は80%と高率であった。この成績は Javadpor の報告²⁸⁾ともほぼ一致している。これらの血清マーカーは、一般に、腫瘍が根治的に処理されれば漸減し陰性となるが、腫瘍の再発により陽性化する。日常臨床において、血清マーカーのみ陽性でCT, リンパ管造影あるいは ^{67}Ga -シンチなどの現有の診断法によって腫瘍病巣を確認できない場合があるが、このように血清マーカーのみ陽性で腫瘍の残存あるいは再発の疑われる場合には、血清マーカーに対する抗体を用いた Radioimmunodetection が有力であろうと考えられている。すでに AFP 抗体については詳細な研究がなされ¹¹⁻¹⁴⁾、肝癌や睾丸腫瘍の Radioimmunodetection に応用されているのに対し、これらに関する hCG の有用性を論じた報告は少ない。

hCG が α , β ふたつの subunit から構成され、そのホルモン特異性が β -subunit にあることは前述したが、近年、hCG が腫瘍マーカーとしての有用性を指摘されるようになったのは、この β -subunit 系を導入したラジオイムノアッセイ法が確立され、微量の hCG 測定が可能となって以来である。ちなみに、hCG は正常男子血清中には ng/ml 単位では認められないため通常のラジオイムノアッセイ法で hCG 陽性ならすべて異常と判断される。この点で、正常ヒトでも証明される CEA や AFP と比較し、ユニークな血清マーカーであるといえる。

著者の教室では睾丸腫瘍の診断および治療方針の決定において、hCG- β 抗血清を用いた間接 PAP 法による hCG の組織学的局在診断をすでにルーチン化しており、その有用性については島谷ら⁶⁾が報告している。しかし、hCG 産生腫瘍の中には hCG- α 抗血清に対し、immunoperoxidase reaction が認められるものもあること²⁹⁾、また、Boime ら³⁰⁾は正常絨毛組織において α と β -subunit それぞれの m-RNA が別個に存在することを確認しており、腫瘍組織のうちにおいても hCG とは別に free subunit が存在するものと推定される。本実験に使用した GCH-Inu 株について、その腫瘍組織中の hCG がいかなる状態で存在するかはあきらかでないが、hCG, α および β -subunit 抗血清に対する immunoperoxidase reac-

tion が認められたことから、少なくとも本実験系において GCH-Inu 株を用いることには問題ないと思われた。

腫瘍性絨毛の産生する hCG の性格については、その糖部分に変異性が報告されているが、アミノ酸組成には正常妊娠由来の hCG との間に差がなく、その免疫原性についてはほぼ同一であろう^{31,32}と考えられている。したがって、本実験系において正常妊婦由来の hCG に対する抗体を使用することには妥当性があると考えられた。

このような事項を考慮したうえで、著者は正常妊婦由来の hCG および hCG- β に対する抗体を精製し、hCG 産生腫瘍の体外からの局在診断に応用すべく本研究をおこなった。その結果、¹³¹I-anti hCG, ¹³¹I-anti hCG- β とともに腫瘍への特異的な集積が認められたが、後者を用いた場合はより明瞭な腫瘍イメージを描出させることに成功した。すなわち、¹³¹I-anti AFP を用いた石井¹³、柳沢ら¹⁴の動物実験では3日目以降に腫瘍イメージの描出が可能であったと報告しているが、今回著者の精製した hCG- β 抗体を用いると24時間後には明瞭な腫瘍イメージの描出が可能であった。

最後に、今回の動物実験における基礎的な問題について述べる。

Goldenberg ら³³は動物モデルとしてハムスターあるいはサルを用い、石井、柳沢ら^{13,14}はラットあるいはヌードマウスを用いている。著者は次にあげる利点によってヌードマウスを使用した。①腫瘍のものの性格が失われず継代されること。②転移がきわめて稀であるため、シンチグラフィの解読にあたり、アイソトープの転移巣への集積を考慮しないでよいこと。③移植、継代が容易であることなどである。一般にヌードマウスに移植された腫瘍の転移はほとんどないとされる³⁴が、今回使用した GCH-Inu 株は田中の報告²³によれば10~20%に肺、リンパ節への転移巣を形成する。しかし、本実験に供したヌードマウスを剖検したところ、少なくとも肉眼的には転移巣を認めなかったため、転移巣へのアイソトープ集積は考慮していない。いっぽう、ヌードマウスにおいては腫瘍と体重の比がヒトよりはるかに大きいことから、ヒトにおける hCG 分泌状態とはかなり差があると考えられる。また、柳沢ら¹⁴はヌードマウスでは ¹³¹I-anti AFP を用いて腫瘍イメージの描出が可能でありながら、臨床例では明瞭なイメージが得られなかったと報告していることから、今回の動物実験のみでヒトにおける有用性を断定することはできない。

つぎに、問題となるのはアイソトープの選択および

アイソトープ標識法である。今回、各臓器の放射能分布を検索する目的では ¹²⁵I を用いたが、腫瘍イメージの描出には ¹³¹I を用いた。これは、¹²⁵I のエネルギーが 38 MeV で、シンチレーションカメラの調節幅以下であるとの理由による。なお、¹³¹I は半減期が8日と短いため、臨床応用に適すると考えられる。

標識方法はいろいろ報告されているが、今回はもっとも一般的な蛋白標識法であるクロロミンT法を用いた。Marchalonis JJ ら³⁵は IgG の Lactoperoxidase 法による標識法を報告しているが、本法は蛋白に与える障害が少ないという利点を有しており、今後検討を要すると考えられる。

以上、著者の精製した hCG 抗体、特に hCG- β 抗体は hCG 産生腫瘍の Radioimmunoassay 法に有用であろうとの結果を得た。今後、臨床応用を予定しているが、本抗体は異種蛋白であることから副作用の有無について厳重なチェックが必要である。また、hCG 抗体をヒトに投与した場合、LH との交叉反応による下垂体への影響を考慮せねばならない。この点に関し、hCG 抗体を臨床例に応用した Goldenberg¹⁶、Begent¹⁵は特に考察を加えていないが、LH と交叉反応の少ない hCG- β 抗体の使用がより安全と推察される。いずれにせよ、本法の臨床応用に際しては、これらの問題点を十分解明した上で、慎重に実施せねばならないと考えている。

結 語

hCG および hCG- β subunit に対する抗体を精製し、そのラジオアイソトープ化合物によって担癌ヌードマウスにおける hCG 産生腫瘍の局在診断を試み、次の結果が得られた。

1) hCG 産生腫瘍を移植したヌードマウスに ¹²⁵I-anti hCG- β を投与し、組織内放射能分布を測定したところ、両者とも腫瘍への特異的な集積が認められた。とくに、後者は、投与3日目には肝への非特異的な集積に対し、約4倍と著明な集積が認められた。

2) 本実験に使用した GCH-Inu 株に対し、間接 Peroxidase-antiperoxidase 法を実施して、syncytiotrophoblast 様細胞に immunoperoxidase reaction が認められたことから、これら抗体の腫瘍への集積は免疫学的に特異的な現象であると考えられた。

3) hCG 産生腫瘍 (GCH-Inu 株) 担癌ヌードマウスに ¹³¹I-anti hCG あるいは ¹³¹I-anti hCG- β subunit を投与し、シンチスキャンニングをおこなったところ、腫瘍を hot area として描出することに成功した。とくに β -subunit 抗体を用いたものでは、

きわめて明瞭な腫瘍イメージが描出された。

本論文の要旨は第20回日本病治療学会総会および第32回泌尿器科中部連合総会において発表した。

稿を終えるにあたり、終始御指導ならびに御校閲を賜りました恩師石神襄次教授に深甚なる感謝の意を表します。本研究に際し直接御指導いただきました守殿貞夫助教授ならびに多くの助言をいただいた本学産婦人科教室西村隆一郎博士に感謝の意を表します。また、GCH-Inu 株を提供いただいた新潟大学産婦人科教室竹内正七教授に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Einhorn LH: Testicular cancer as a model for a curable neoplasma: The Richard and Hinfa Rosenthal Fondatin Award Lecture. *Cancer Res* **41**: 3275~3280, 1981
- 2) Lange PH, McIntire KR, Waldmann TA, Hakala TR and Fraly EE: Serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in the diagnosis and management of non seminomatous germ cell testicular cancer. *New Eng J Med* **295**: 1237~1240, 1976
- 3) Javadpour N, McIntire KR, Waldman TA and Bergman SM: The role of alphafetoprotein and human chorionic gonadotropin in Seminoma. *J Urol* **120**: 687~690, 1978
- 4) 荒川創一・島谷 昇・浜見 学・藤井昭男・彦坂幸治・守殿貞夫: 睾丸腫瘍における血清 marker—血清 AFP の理論的および実測減衰線の臨床的意義. *泌尿紀要* **26**: 1505~1511, 1980
- 5) 守殿貞夫・荒川創一・増田宗義・浜見 学・島谷昇・伊藤 登・中塚栄治・藤井昭男・大野三太郎・石神襄次・服部正宏・吉本祥生・藤田拓男・岡田 聡: 睾丸腫瘍における血清 marker の意義—血清 β -subunit human chorionic gonadotropin および α -fetoprotein について—。 *日泌会誌* **71**: 352~362, 1980
- 6) 島谷 昇・荒川創一・増田宗義・守殿貞夫: 睾丸腫瘍組織における human chorionic gonadotropin, β_1 pregnancy specific glycoprotein および alphafetoprotein 産生細胞に関する研究. *日泌会誌* **72**: 1164~1176, 1981
- 7) Primus FJ, Wang RH, Goldenberg DM and Hansen HJ: Localization of human GW-39 tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **33**: 2977~2982, 1973
- 8) Goldenberg DM, Preston DF, Primus FJ and Hansen HJ: Photoscan localization of GW-39 tumors in hamsters using radioabeled anticarcinoembryonic antigen immunoglobulin G. *Cancer Res* **34**: 1~9, 1974
- 9) Primus FJ, MacDonald R, Goldenberg DM and Hansen HJ: Localization of GW-39 human tumors in hamsters by antigen. *Cancer Res* **37**: 1544~1547, 1977
- 10) Goldenberg DM, DeLand F, Kim E, Bennet S, Primus FJ, van Nagell JR Jr, Estes N, Desimone P and Rayburn P: Use of Radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancer by external photoscanning. *N Eng J Med* **298**: 1384~1388, 1978
- 11) Nishi S and Hirai H: Isolation and characterization of human fetal alpha-globulin from sera of fetuses and a hepatoma patients. *Cancer Res* **30**: 2507~2513, 1973
- 12) Kim EE, Deland FH, Nelsor MO, Bennet S, Simmons G, Alpert E and Goldenberg DM: Radioimmunodetection of cancer with radiolabeled antibodies to alphafetoprotein. *Cancer Res* **40**: 3008~3012, 1980
- 13) 石井伸子・中田恵輔・室 豊吉・古河隆三・河野健次・楠本征夫・棟久龍夫・小路敏彦・長瀧重信・原 彰彦・日比 望・塚田 裕・平井秀松: 放射標識 AFP 抗体による癌の局在診断. *癌と化学療法* **9**: Suppl I: 61~69, 1982
- 14) 柳沢宗利・三木 誠・平井秀松: AFP 産生ヒト生殖細胞腫瘍の実験的研究—放射性ヨード標識抗ヒト AFP 特異抗体による腫瘍のイメージングについて—。 *日泌会誌* **72**: 1551~1568, 1981
- 15) Begent RHJ, Searle F, Stanway G, Jewkes RF, Jones BE, Vernon P and Bagshawe KD: Radioimmunolocalization of tumors by external scitigraphy after administration of ^{131}I antibody to human chorionic gonadotropin. *J Roy Soc med* **73**: 624~630, 1980
- 16) Goldenberg DM, Kim EE, Deland FH, Van Nagell JR and Javadpour N: Clinical radioimmunodetection of cancer with radioactive antibodies to human chorionic gonadotropin. *Science* **208**: 1284~1296, 1980
- 17) Quinones J, Mizejewski G and Beierwaltes WH:

- Choriocarcinoma scanning using radiolabeled antibody to chorionic gonadotropin. *J Nucl Med* **12**: 69~75, 1971
- 18) Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E and Ross GT: A method for producing antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocr* **33**: 988~991, 1971
 - 19) Hansen HJ, Snyder JJ and Miller E: Carcino-embryonic antigen (CEA) assay: a laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer. *Hum Pathol* **5**: 139~147, 1974
 - 20) Ashitaka Y, Nishimura R, Endoh Y and Tojo S: Subunits of human chorionic gonadotropin and their radioimmunoassays. *Endocrinol Jpn* **21**: 429~435, 1974
 - 21) 尾上 蕉: Immunoabsorbent による抗体の精製法 (改良法). 免疫実験操作法: 809~813, 1974
 - 22) 尾上 蕉: 蛋白抗原の ^{131}I による標識法. 免疫実験操作法: 174~175, 1971
 - 23) 田中憲一: ヒト絨毛癌細胞培養株の樹立とその性状. 新潟医学会雑誌 **95**: 95~105, 1981
 - 24) Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ and Meyer HG: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase anti horseradishperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* **18**: 315~333, 1970
 - 25) McCardle RJ, Harper PV and Spar IL: Studies with iodine-131-labeled antibody to human fibrinogen for diagnosis and therapy of tumors. *J Nucl Med* **7**: 837~847, 1966
 - 26) Spar IL, Harper PV, Bale WF, McCardle RJ and Goodland RL: Localization of ^{131}I -labeled antibodies to fibrinogen in human tumors. *Proc Am Assn Cancer Res* **4**: 65, 1963
 - 27) Belitsky P, Ghose T, Aguino, J Norvell ST and Blair AH: Radionuclide imaging of primary renal cell carcinoma by I-131-labeled antibody. *J Nucl Med* **19**: 427~430, 1978
 - 28) Javadpor N: The national cancer institute experience with testicular cancer. *J Urol* **120**: 651~659, 1978
 - 29) Furumoto M: Cellular localization of AFP, hCG and its free subunits, and SP₁ in embryonal carcinoma of the testis and orary. *Path Res Pract* **173**: 12~21, 1981
 - 30) Boime, I Landefeld, T McQueen S and McWilliams D: The biosynthesis of chorionic gonadotropin and placental lactogen in first-and third-trimester human placenta. 235~257, Ed. by K. W. Mckerns, Structure and Function of the Gonadotropins, Plenum Press, Ne York, 1978
 - 31) Lewis J, Dray S Jr, Genuth S and Schwartz: HS Determination of immunological similarities of human pregnancy gonadotropin and choriocarcinoma gonadotropin with antisera prepared in rabbits and monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 197~204, 1964
 - 32) 西村隆一郎・浜本 保・田辺恭三・竹森正幸・足高善彦・東條伸平: 胞状奇胎患者尿中 hCG の生物学的, 生化学的性格とそのラジオイムノアッセイ. 日本内分泌学会雑誌 **57**: 1632~1644, 1981
 - 33) Goldenberg, DM Primus FJ and DeLand F: Tumor detection and localization with purified antibodies to carcinoembryonic antigen. 265-304, ED. by Ronald B.Herberman, K.Robert McIntire, Immunodiagnosis of cancer, Dekker Press, New York, 1979
 - 34) 大沢伸昭: 先天性胸腺欠損マウス (nude mouse). 代謝 **11**: 763~772, 1974
 - 35) Marchalonis JJ: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and proteins. *Biochem J* **113**: 299~305, 1969

(1983年2月18日迅速掲載受付)